

桑黄多糖超声波协同纤维素酶法提取的工艺优化

程伟, 秦俊哲, 杜军国, 张春华

(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西西安 710021)

摘要: 在单因素试验的基础上, 根据中心组合设计原理采用四因素三水平的响应曲面分析法, 对超声波协同纤维素酶法提取桑黄多糖工艺进行优化研究; 同时采用红外光谱仪扫描分析, 确定其基团类型。结果表明: 较适宜提取工艺条件为超声温度 54 ℃、pH 5.1、超声时间 39 min、超声功率 240 W, 在此优化条件下, 桑黄多糖得率可达 5.30%; 红外光谱扫描结果表明协同提取的多糖和热水浸提所得多糖的红外光谱图基本吻合。

关键词: 桑黄; 多糖; 纤维素酶; 超声波; 红外光谱

文章编号: 1673-9078(2012)6-662-666

Optimization of Ultrasonic-assisted Enzymatic Extraction of Polysaccharide from *Phellinus igniarius*

CHENG Wei, QIN Jun-zhe, DU Jun-guo, ZHANG Chun-hua

(School of life science and engineering, Shaanxi university of science and technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: Ultrasonic-assisted extraction was applied to improve the cellulase-catalyzed extraction yield of polysaccharide from *Phellinus igniarius*. Based on the single factor experiments, four factors and three levels of response surface analysis method was adopted to optimize the extraction process based on central composite design principle. Infrared spectrometry was used to analyze the structural characteristics of the extracted polysaccharide from *Phellinus igniarius*. Results showed that the suitable extraction processing conditions were ultrasonic treatment temperature 54℃, pH 5.1, ultrasonic treatment time 39 min and ultrasonic treatment power 240w. Under the optimum conditions, the yield of *Phellinus igniarius* polysaccharide was up to 5.30%. Infrared spectroscopy indicated that the observed major functional groups in *Phellinus igniarius* polysaccharide were consistent with those extracted by hot water.

Key words: *Phellinus igniarius*; polysaccharide; cellulose; ultrasonic wave; infrared spectroscopy

桑黄 (*Phellinus linteus*) 是一种具有显著抗癌活性的药用真菌^[1], 其主要功效成分是多糖, 在免疫调节、抗衰老、降血糖、抗病毒等方面也具有重要活性作用^[2]。桑黄多糖常见的提取方法多为水提醇沉, 虽简便易行, 但得率较低, 工作量大^[3]; 为了优化提取过程, 不同学者从不同的角度进行研究如超声波强化提取^[4]、酶法提取、微波提取等。纤维素酶可以切断β-(1,4)键, 从而破坏真菌细胞壁, 增加细胞壁的通透性, 促进其中的有效成份的提取^[5,6]。

本试验在单因素试验基础上, 采用响应面分析法研究了超声波协同纤维素酶法提取的可行性, 对提取工艺进行优化; 并采用红外光谱扫描观察协同提取对多糖结构的影响, 为物理、化学和酶法的有效结合提

取多糖提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

桑黄子实体由本实验室人工培育, 菌种为日本桑黄(R); 纤维素酶(酶活>15 U/mg), 上海伯奥生物科技有限公司; 实验所用试剂均为分析纯; FTIR Nicolet 5700 傅里叶红外光谱仪, 美国热电尼高力公司; 756PC 紫外可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 旋转蒸发器, 上海荣生有限公司; KQ-100DE 型数控超声波清洗机, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 桑黄多糖的协同提取

取干燥的桑黄子实体, 粉碎、乙醇浸提过夜、抽滤, 取滤渣风干粉碎备用。称取 1 g 预处理子实体粉, 按料液比 1:30 (g/mL)加水混匀, 用柠檬酸调 pH 值, 加纤维素酶, 在一定温度、超声功率、超声时间下提取, 再立即置于 80 ℃水浴灭活纤维素酶继续浸提 1 h,

收稿日期: 2012-03-17

基金项目: 陕西省教育厅自然科学基金项目 (08JK232)

作者简介: 程伟(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食药用真菌资源研究与应用, 真菌多糖研究

通讯作者: 秦俊哲, 教授级高级工程师

抽滤，定容到 100 mL，测吸光度。

1.2.2 桑黄多糖含量的测定

采用苯酚-硫酸法测定水溶性总糖质量，DNS 法测定还原糖质量。

$$\text{多糖质量(g)} = \text{总糖质量(g)} - \text{还原糖质量(g)}$$

$$\text{多糖得率(\%)} = [\text{多糖质量(g)} / \text{原料质量(g)}] \times 100\%$$

1.2.3 单因素试验

针对超声波协同纤维素酶法提取桑黄多糖工艺的主要影响因素：加酶量、超声时间、超声温度、超声功率、pH 值等，进行单因素试验，考察各因素对桑黄多糖得率的影响，选择较适宜的提取工艺。

1.2.4 响应曲面法试验设计

综合单因素试验结果，采用响应面法建立数学模型优化提取工艺，在确定料液比 1:30 (g/mL)，1%加酶量的情况下，分别用 A、B、C、D 表示超声时间、超声功率、pH 和超声温度。利用 Box-Behnken 中心组合设计(BBD)原理设计正交试验，见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验编码表

Table 1 The factors level coding table of Box-Behnken

水平	因素			
	A(超声时间/min)	B(超声功率/W)	C(pH)	D(超声温度/°C)
-1	30	210	4.5	50
0	40	240	5	55
1	50	270	5.5	60

1.2.5 桑黄多糖的精制

提取液离心，取上清液，大孔树脂脱蛋白后，经 DEAE-纤维素蒸馏水洗脱分离，浓缩，乙醇沉淀，依次用丙酮、乙醚、无水乙醇洗涤沉淀，真空干燥至恒重得精制多糖^[7]。

1.2.6 桑黄多糖的红外光谱测定

分别采用热水浸提法和超声波协同纤维素酶法提取桑黄多糖，并精制；分别称取 2.0 mg 精制多糖，与 200 mg KBr 混合研磨后压片，红外光谱仪扫描分析，波长范围为 4000~500 cm⁻¹，确定其基团类型。

2 结果

2.1 单因素试验

2.1.1 加酶量的确定

图 1 (a) 可见，多糖得率随加酶量增加而显著增加，加酶量在 1% 时，得率达到最大值；而后随着酶量的增加，得率下降，主要是由于过量的纤维素酶可能导致多糖的降解而降低得率。

2.1.2 超声时间的确定

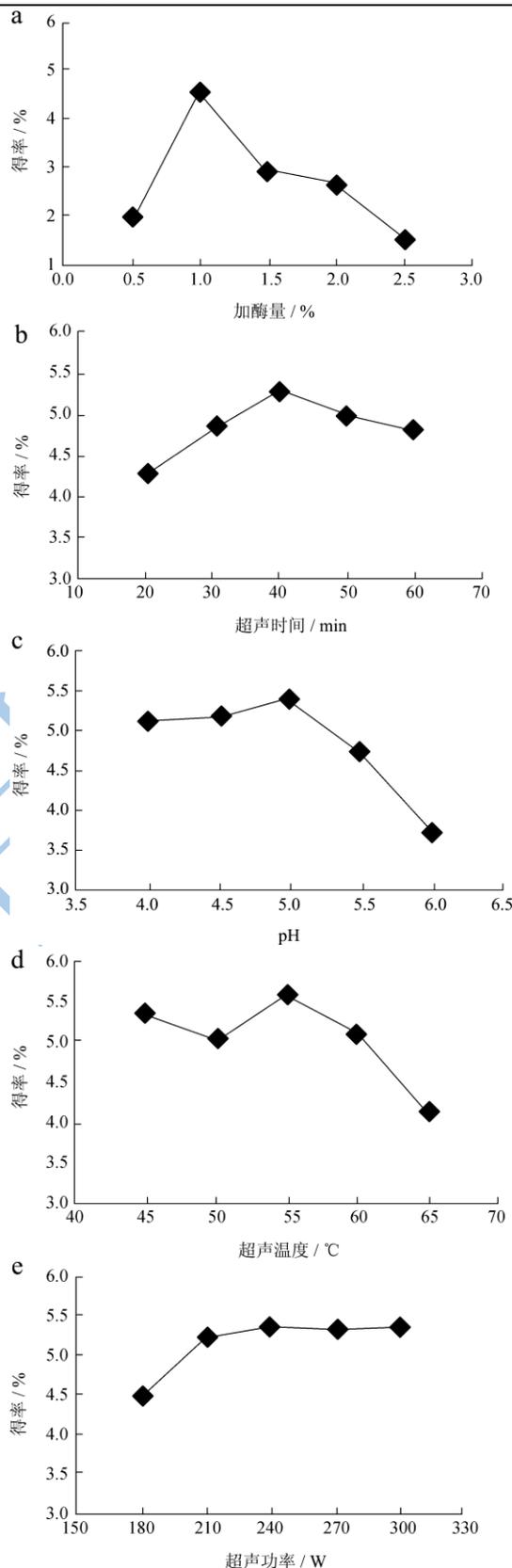


图 1 各因素对桑黄多糖得率的影响

Fig.1 Results of single factor investigations on the effects of the dosage of enzyme (a), ultrasonic treatment time (b), pH (c), ultrasonic treatment temperature (d) and ultrasonic power (e) on the yield of polysaccharides

超声时间在 40 min 之内,得率随时间的增加而明显增大,到 40 min 时达到最大值;而后随着时间的增加,得率开始缓慢下降,见图 1 (b); 主要由于超声波的空化效应作用时间过长,可能导致糖苷键断裂,多糖降解。故超声作用时间选取 40 min 为宜。

2.1.3 酶解 pH 值的确定

pH 值是影响酶活的主要因素之一。由图 1 (c) 可知多糖得率随 pH 值的增加而增大,高于最适 pH 值 5.0 之后开始降低; 过高或过低的 pH 值都会影响纤维素酶活性,过高的酸浓度还会使多糖中糖苷键发生断裂而引起多糖结构破坏; 在 pH 值 5.0 时纤维素酶活较强,细胞壁的降解加速,使细胞壁内的多糖更容易溶出。因此,超声协同酶解的较适宜 pH 5.0。

2.1.4 超声温度的确定

当温度低于 55 °C 时,多糖得率随着温度的升高而显著增大; 而当温度高于 55 °C 时,多糖得率反而随温度的升高而降低,从图 1 (d) 可以看出; 这是因为温度过高导致纤维素酶失活,从而影响了细胞壁中几丁质的降解,最终影响了多糖的提取。因此,55 °C 为酶解的较适宜温度。

2.1.5 超声功率的确定

从图 1 (e) 可以看出,随着超声功率的增加,多糖得率显著提高,这主要是由于超声波能够破坏细胞壁和细胞膜的结构,使细胞破裂,胞内多糖溶出速率增加; 功率越大,破碎作用越强,同时更有利于纤维素酶充分作用于细胞壁中的几丁质,多糖得率显著提高; 当超声波功率过大,虽更利于多糖的溶出,但强超声波作用可能导致多糖糖苷键断裂和纤维素酶酶活降低,反而使得率下降。本实验较适宜超声功率为 240 W 左右。

2.2 响应曲面试验

2.2.1 试验结果及方差分析

响应面试验结果见表 2,模型方差分析结果见表 3,回归方程系数显著性检验见表 4,当 $P < 0.05$ 时,即表示该项指标显著。

结果表明,对多糖得率建立的二次多项模型具有高度显著性($P < 0.0001$); 失拟项 $P = 0.0732$,不显著; 模型的调整确定系数 $R^2 = 0.8696$,说明该模型能解释响应值的变化。由图 2 可知,残差点几乎分布在同一条直线上,因而该模型拟合程度较好,试验误差小。可以用此模型对桑黄多糖的超声波协同纤维素酶法提取工艺进行分析和预测。

对实验数据进行多项式拟合,以得率为因变量 (R),建立回归方程,因素代码形式如下:

$$R = 5.54 + 0.12A + 0.14B + 0.33C + 0.08D - 0.36AB$$

$-0.35AC - 0.56AD - 0.04BC - 0.26BD - 0.26CD - 0.41A^2 - 0.71B^2 - 0.64C^2 - 0.73D^2$ 。由回归方程的方差分析结果可知: C、AB、AC、AD、BD、 A^2 对 R 值的影响显著 ($P < 0.05$), B^2 、 C^2 、 D^2 对 R 值的影响非常显著 ($P < 0.001$)。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 The experimental design and results of Box-Behnken

试验编号	A	B	C	D	得率/%
1	0	1	1	0	4.48
2	-1	1	0	0	4.95
3	0	0	0	0	5.58
4	0	0	-1	-1	3.38
5	-1	-1	0	0	3.75
6	0	0	0	0	5.56
7	0	0	0	0	5.28
8	1	-1	0	0	4.54
9	0	1	-1	0	3.75
10	1	0	-1	0	4.69
11	1	1	0	0	4.31
12	0	0	1	-1	4.71
13	0	-1	0	-1	3.85
14	-1	0	-1	0	3.82
15	-1	0	1	0	4.88
16	0	0	-1	1	4.08
17	0	-1	0	1	4.12
18	0	-1	1	0	4.32
19	1	0	0	1	4.15
20	0	0	0	0	5.39
21	0	0	1	1	4.39
22	0	0	0	0	5.42
23	-1	0	0	-1	3.14
24	1	0	1	0	4.35
25	0	1	0	1	3.72
26	1	0	0	-1	4.72
27	-1	0	0	1	4.81
28	0	1	0	-1	4.51
29	0	-1	-1	0	4.43

表 3 回归模型方差分析表

Table 3 Variance analysis of the developed regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
回归模型	11.52	14	0.82	14.34	<0.0001
残差	0.80	14	0.057		
失拟	0.74	10	0.074	4.75	0.0732
纯误差	0.062	4	0.016		
总误差	12.32	28			

结果表明一次项和二次项都有显著性因素,各试

验因素对响应值的影响不是简单的线性关系，因素间的交互作用影响较小。由此推断，可以利用该回归方程来确定桑黄多糖的超声波协同纤维素酶法提取工艺条件。

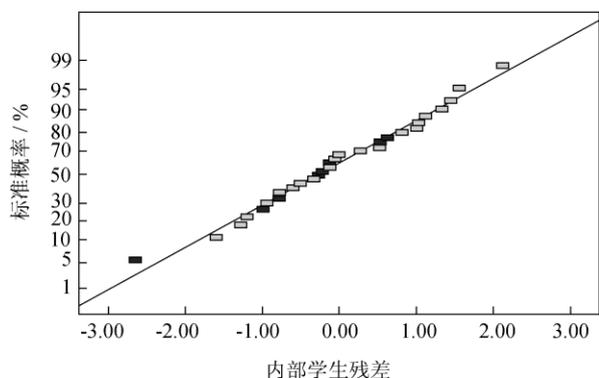


图2 多糖得率的残差分布图

Fig.2 Distribution of internally studentized residuals of the yield of polysaccharide

表4 回归方程系数显著性检验

Table 4 Significance test for the regression coefficients of the developed regression equation

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	11.52	14	0.82	14.34	<0.0001	***
A	0.17	1	0.17	2.89	0.1113	
B	0.24	1	0.24	4.25	0.0584	
C	1.32	1	1.32	23.01	0.0003	**
D	0.077	1	0.077	1.34	0.2666	
AB	0.51	1	0.51	8.91	0.0098	**
AC	0.49	1	0.49	8.54	0.0111	**
AD	1.25	1	1.25	21.87	0.0004	**
BC	6.400E-003	1	6.400E-003	0.11	0.7433	
BD	0.28	1	0.28	4.90	0.0440	**
CD	0.26	1	0.26	4.53	0.0515	
A ²	1.10	1	1.10	19.13	0.0006	**
B ²	3.26	1	3.26	56.81	< 0.0001	***
C ²	2.66	1	2.66	46.33	< 0.0001	***
D ²	3.43	1	3.43	59.86	< 0.0001	***

注：“***” $P < 0.01$ 极显著；“**” $0.01 < P < 0.05$ 显著；“-”

$0.05 < P$ 不显著。

2.2.2 响应面分析

等高线的形状可以反映出交互效应的强弱，越趋向椭圆表示交互作用越强，越趋向圆形则交互作用越弱^[8]。通过模型方程所作的响应曲面图及其等高线，结果见图3，可以看出pH对多糖得率的影响最显著，其次是提取温度，这与方差分析的结果一致；一次项和二次项都有显著性因素，因素间的交互作用影响较

小。通过 Design Expert 分析得到模型最佳数据，为检验上述方法的可靠性，同时考虑到实际操作情况，将最佳提取条件修正为提取温度 54 °C、pH 5.1、超声时间 39 min、超声功率 240 W，3 次平行试验的平均得率为 5.30%，与理论值 5.49% 接近。因此采用响应曲面法优化得到的超声波提取条件参数基本准确可靠，具有一定实用价值。

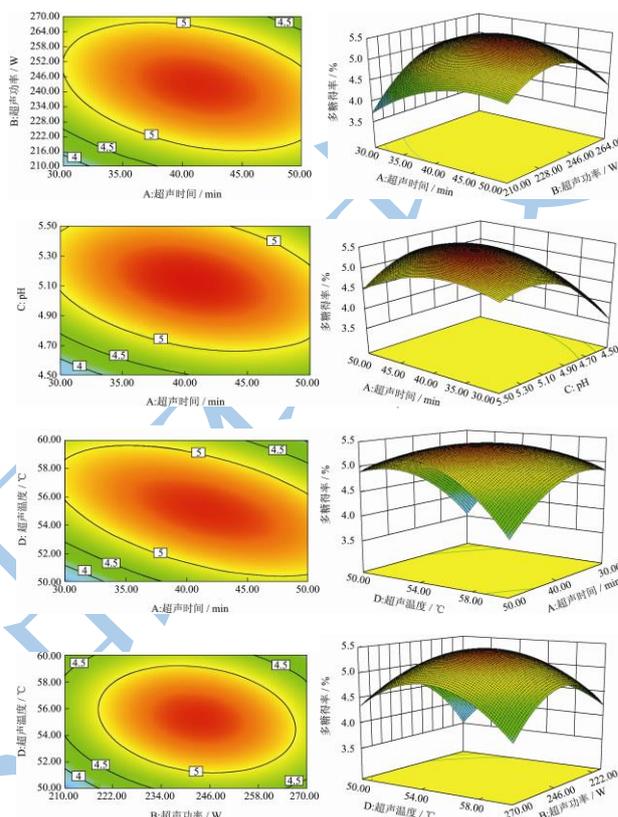


图3 各显著因素及其交互作用对多糖得率影响的响应曲面图及其等高线

Fig.3 Results of significant factors and their interaction investigations on the effects of ultrasonic treatment time, pH, ultrasonic treatment temperature and ultrasonic power on the yield of polysaccharide

2.3 桑黄多糖的红外光谱测定

经红外光谱分析，协同提取所得桑黄多糖(图4、a)具有以下结构特征：在 3400 cm^{-1} 附近出现的宽吸收峰为糖类的 O-H 伸缩振动的强吸收； 2928.56 cm^{-1} 处的吸收峰是(-CH₂-)中 C-H 的伸缩振动的表现；同时 1384.95 cm^{-1} 处存在吸收峰是 C-H 的变角振动，这与 C-H 的伸缩振动形成了糖环的特征吸收峰；由这几组峰可以初步判断该化合物为糖类化合物。此外还存在有羧基的(C=O)的伸缩振动峰，乙酰氨基(-NHCOCH₃)的 N-H 变角振动峰，说明桑黄多糖中可能有少量与糖相结合的蛋白质的存在。

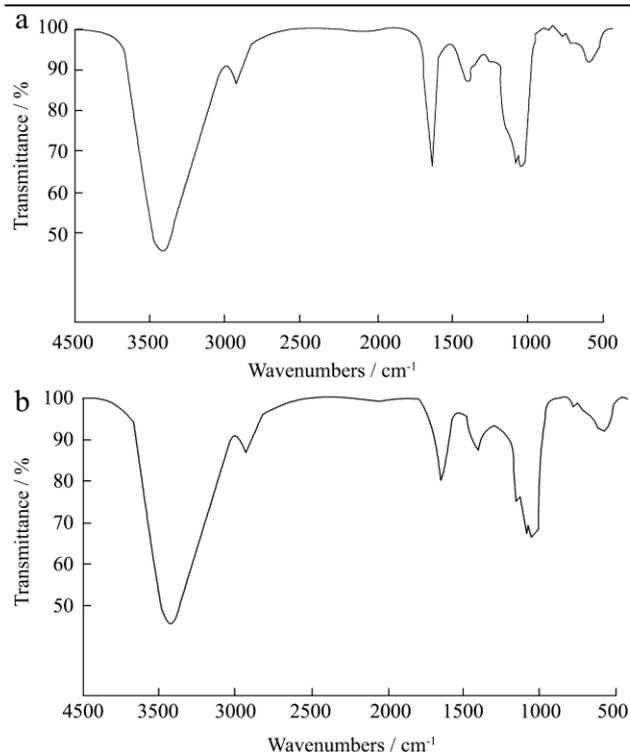


图4 超声波协同辅助纤维素酶法 (a)、热水法 (b) 提取多糖的红外光谱图

Fig.4 Infrared spectroscopy of polysaccharide extracted by ultrasonic assisted cellulase (a)、hot water (b)

从红外分析的结果可以看出, 超声波协同纤维素酶提取的多糖与热水浸提的多糖(图 4a、4b)红外光谱图基本吻合, 主要官能团没有差异, 其固有的生理活性基础物质没有发生质的变化。

3 结论

3.1 本试验通过单因素和响应面分析, 确定超声波协同纤维素酶提取桑黄多糖的较适宜工艺条件: 超声温度 54 °C、pH 5.1、超声时间 39 min、超声功率 240 W; 在此优化条件下, 桑黄多糖的得率可达 5.30%, 较仅采用单一水提法或超声波提取法多糖得率显著提高。

3.2 酶解法条件温和, 负面的化学反应较少, 无污染, 但酶解法的应用受到酶的价格及酶解时间的制约, 能否降低生产成本是酶法破壁工业应用的关键^[9]。超声波的空化效应和振动作用, 促进细胞壁的破裂^[10], 同时超声波还有助于纤维素酶与桑黄子实体中的纤维素

充分作用, 双重作用大大加速了细胞壁纤维素的降解和多糖的溶出^[11-12]。但是还需对超声波协同纤维素酶提取所得多糖的生物活性影响进行深入的研究。

参考文献

- [1] KONG KH, KIM HM, HONG DN, et al. The inhibitory effect of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis[J]. Immunopharmacology, 1999, 41: 157-164
- [2] KIM GY, PARK SK, LEE MK, et al. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosinase[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3: 1281-1292
- [3] 杨云,张晶,陈玉婷.天然药物化学成分提取分离手册[M].北京,中国中医药出版社,2003
- [4] 彭川丛,孔静,游丽君,等.超声波辅助热水浸提香菇多糖响应面优化工艺及其抗氧化活性的研究[J].现代食品科技, 2011,27(4):452-456
- [5] 于淑娟,高大维,李国基,等.超声波酶法提取灵芝多糖的机理研究[J].华南理工大学学报(自然科学版),1999,26(4): 122-124
- [6] 高培基.纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J].自然科学进展,2003,13(1):21-29
- [7] 张慧洋.桑黄菌丝体多糖的分离、纯化及结构初探[D].陕西科技大学,2010
- [8] 崔凤杰,徐泓瑜,舒畅,等.响应曲面法优化灰树花水溶性多糖提取工艺的研究[J].食品科学,2006,27(4):142-151
- [9] Muniswaran P K A, Ehaywlu N C T N. Solid Substrate fermentation of coconut coirpith for Cellulase production [J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16(5): 436-400
- [10] 陈德育,田广文,李学俊,等.超声波提取猪苓菌丝多糖工艺优选[J].食用菌,2006,6:60-62
- [11] 罗仓学,朱妞,雷学锋,等.纤维素酶法提取辣椒碱的工艺研究[J].现代食品科技,2007,23(11):47-50
- [12] 于淑娟,高大维,闵亚光,等.超声波作用下纤维素酶水解反应动力学研究[J].厦门大学学报(自然科学版),1997, 36(3):424-426